Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Kurt Kochsiek

Ein Schnelltest zur Differenzierung von Proteinurien

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von
Ulrike Otremba
aus Würzburg

Würzburg, den 28. Mai 1982

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. Kurt Kochsiek

EIN SCHNELLTEST ZUR DIFFERENZIERUNG VON PROTEINURIEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Ulrike Otremba

aus Würzburg

Würzburg, den 28.Mai 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent:	Prof. Dr.med. August Heidland
Korreferent:	Prof. Dr.med. Kurt Kochsiek
Dekan:	Prof. Dr.med. Karl-August Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 15.Juli 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543526_0010

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG

1.1. Die Bedeutung der Urinproteindifferenzierung 1
1.2. Die Definition der Proteinurie 1
1.3. Der Pathomechanismus der Proteinurie 2
1.3.1. Die prärenale Proteinurie 2
1.3.2. Die nephrogene Proteinurie 3
1.3.3. Die postrenale Proteinurie 3
1.3.4. Die renale Proteinurie 4
a) glomerulär: nicht-selektiv 5
selektiv
mäßig-nicht-selektiv
b) tubulär 6
1.4. Die Proteinnachweismethoden im Urin 7
1.5. Die Problemstellung 7

2. METHODIK

2.1. Die Aufbereitung der Urine 9
2.2. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 9
2.2.1. Die Herstellung der Stammlösungen 10
2.2.2. Das Gießen der Gele 10
2.2.3. Das Färben 11
2.2.4. Das Entfärben 11
2.2.5. Die Auswertung 13
2.3. Die Überprüfung der Ergebnisse 14
2.3.1. Die Immundiffusion 14
2.3.2. Die Biuret-Eiweißbestimmung 15

Seite

3. ERGEBNISSE

3.1. Die Proteinbestimmung im Urin 16
3.2. Die Vorbehandlung der Urine für die Elektrophorese 17
3.3. Die Bedeutung des pH-Wertes der aufzutrennenden Proteinprobe 19
3.4. Typische Bandenmuster der verschiedenen Proteinurieformen 22

4. DISKUSSION

4.1. Der Vergleich mit anderen Proteindifferenzierungsmethoden 28
4.2. Die Nachteile des ß-Mercaptoäthanol 30
4.3. Die Lösung der Konzentrierungsprobleme 35
4.4. Die Ergebnisse dieser Methode im Gegensatz zu Differenzierungsschwierigkeiten mittels Immundiffusion und Selektivitätsindex 36

5. ZUSAMMENFASSUNG 39

6. LITERATURVERZEICHNIS 41

MEINEN ELTERN
HEINZ UND HANNI OTREMBA
IN DANKBARKEIT

1. EINLEITUNG

1.1. Die Bedeutung der Urinproteindifferenzierung

Seit Richard Bright im Jahre 1827 erkannte, daß eine Proteinurie ein diagnostisches Kennzeichen für eine Nierenerkrankung ist, befaßten sich viele Forscher mit der Erklärung dieses Phänomens.

Die Einteilung einer Proteinurie in eine selektive, nicht-selektive, mäßig-nicht-selektive und tubuläre Eiweißausscheidung ist von diagnostischer und therapeutischer Relevanz.

Die Differenzierung ist wichtig zur Frühdiagnose einer Nierenkrankheit und als Bestätigung einer klinischen Therapie (1). Auch Verlaufskontrollen sind möglich, ohne nochmals eine Nierenbiopsie vornehmen zu müssen.

Den umfangreichen Untersuchungen von Creeth et al. (14), Joachim et al. (24), Hardwicke (19, 20, 21, 22), Davies et al. (15), Balant und Fabre (1), sowie Boesken und Mitarbeitern (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) verdanken wir die Zuordnung unterschiedlicher Formen von Proteinurie zu definierten nephrologischen Erkrankungen.

1.2. Die Definition der Proteinurie

Proteinurie heißt Eiweißausscheidung im Urin. Physiologisch ist die Exkretion von 150 mg Protein pro 24 Stunden.

Übersteigt die Proteinausscheidung diesen Wert, aber liegt noch unter 0,5 g / 24 h, so spricht man von "leichter Proteinurie" (16, 20).

Eine "mäßige" Proteinurie" nennt man eine Ausscheidung zwischen 0,5 g und 4,0 g Eiweiß pro Tag. Der tägliche Verlust von mehr als 4 g Protein im Urin wird als "schwere Proteinurie" bezeichnet.

1.3. Der Pathomechanismus der Proteinurie

Hardwicke und Soothill stellten 1967 mehrere Theorien auf, die die Entstehung einer Proteinurie begründeten (20):

1. Proteinurie durch Verlust normaler Plasmaproteine aufgrund erhöhter Permeabilität der glomerulären Kapillarschlingen.

2. Proteinurie durch gestörte tubuläre Reabsorption von gefilterten Proteinen.

3. Proteinurie wegen Sättigung der tubulären Reabsorption nach Filtration großer Mengen von Proteinen mit abnorm hoher Plasmakonzentration.

4. Proteinurie durch abnorme Verluste von Proteinen, die nicht aus dem Plasmafiltrat stammen:
   a) von Zellen aus Niere und Ureter,
   b) vom unteren Harntrakt und aus akzessorischen Drüsen,
   c) aus einer Lymphdrainage in den Harntrakt.

Je nach Lokalisation der Schädigung unterscheidet man (6, 7, 22, 40)

1. prärenale,
2. nephrogene,
3. postrenale,
4. renale Proteinurien.

1.3.1. Die prärenale Proteinurie

Hierbei handelt es sich meist um eine sogenannte "Overflow-Proteinurie". Ein Protein mit einem Molekulargewicht, das kleiner als 70.000 Dalton ist, liegt in abnorm hoher Serumkonzentration vor. Es wird in so großen Mengen glomerulär gefiltert, daß die tubuläre Reabsorption gesättigt ist.

Ein Beispiel hierfür stellt die Myoglobinurie nach einem Trauma mit Muskelgewebszerstörung dar. Myoglobin hat ein Molekulargewicht von 15 000 Dalton.

Ebenso zählt man die bei Überproduktion von Bence-Jones-Eiweißen vermehrte Ausscheidung von Ig L-Ketten (MG 22 000 Dalton) zu der prärenalen Proteinurie. Ihr Nachweis ist ein wichtiges diagnostisches Kriterium des multiplen Myeloms (6).

Auch Lysozym kann bei hohen Serumkonzentrationen im Urin verlorengehen, wie dies bei myeloischen Leukämien der Fall sein kann (22). In Zukunft scheint die Urinproteinbestimmung auch bei der Krebsdiagnostik Bedeutung zu gewinnen, indem man tumorspezifische Polypeptide nachweist.

1.3.2. Die nephrogene Proteinurie

Die Ausscheidung von physiologischen und pathologischen Nierengewebsbestandteilen unterschiedlicher Molekülgröße hat meist nur geringe diagnostische Aussagekraft. Tamm-Horsfall- (MG 600 000 Dalton), Basalmembran- und Bürstensaumproteine werden im Harn in kleinen Mengen festgestellt (3).

1.3.3. Die postrenale Proteinurie

Die Ursachen hierfür liegen im ableitenden Harnsystem. Infolge einer Blutung oder einer lokalen Immunglobulinproduktion bei Entzündungen werden Proteinmoleküle unterschiedlichen Molekulargewichtes ausgeschieden.

1.3.4. Die renale Proteinurie

Diese Art der Proteinurie besitzt sicherlich die größte Bedeutung in der Urinproteindiagnostik.

Bei der glomerulären Filtration handelt es sich um einen passiven Vorgang, der keine Stoffwechselenergie benötigt (16). Es entsteht als Primärharn also ein Ultrafiltrat des Plasmas, dessen Menge und Zusammensetzung vom hydrostatischen Druck und von der glomerulären Permeabilität abhängen. Korpuskuläre Bestandteile und größere Moleküle werden normalerweise zurückgehalten.

Unter physiologischen Bedingungen besitzt die glomeruläre Basalmembran, die eigentliche Filtrationsbarriere, eine Porengröße von 30 bis 60 Å (= Ångström) (16).

Experimente an Normalpersonen haben gezeigt, daß Dextrane mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 15 000 Dalton eine glomeruläre Filtrationsrate wie Wasser haben. Dextran über 50 000 Dalton ist von der glomerulären Filtration so gut wie ausgeschlossen. Allerdings ist Dextran ein ungeladenes Molekül. Geladene Moleküle wie Proteine können mit glomerulären Strukturen Interaktionen eingehen (31).

Für Albumin mit einem Molekulargewicht von 68 000 Dalton und einem Molekularradius von 36 Å beträgt die glomeruläre Filtrationsrate 0,02 % (6). Es werden nur etwa zwei Gramm Albumin pro Tag im Primärharn ausgeschieden (22). Myoglobin mit einem Molekulargewicht von 15 000 Dalton und einem Molekularradius von 20 Å wird zu 75 % glomerulär filtriert (6). Da die Proteinmenge des Endharns normalerweise unter 150 mg liegt (physiologische Proteinurie), muß der größte Teil der filtrierten Substanzen tubulär rückresorbiert werden. Dies geschieht, wie man aufgrund elektronenoptischer Studien weiß, über den Mechanismus der Pinozytose (16).

Die renale Proteinurie wird unterteilt
a) in eine glomeruläre Form, die
   nicht-selektiv,
   selektiv,
   mäßig-nicht-selektiv sein kann, und
b) in eine tubuläre Form.

a) Die glomeruläre Proteinurie

Diese Art der Proteinurie geht meist mit einem massiven Eiweißverlust über die Niere einher (mehr als 3 g pro Tag). Sie tritt bei schweren proliferativen Veränderungen am glomerulären System auf. Im Endharn finden sich bevorzugt Proteine mit einem Molekulargewicht von 60 000 Dalton und höher.

Liegt die Schädigung in der glomerulären Basalmembran und/oder im Mesangium, handelt es sich meist um eine n i c h t - s e l e k t i v e Proteinurie. Ausgeschieden werden Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 60 000 und 1 000 000 Dalton. Mit dieser Art von Proteinurie sind vergesellschaftet:
die terminale Glomerulonephritis,
die diabetische und hypertensive Glomerulosklerose,
die mesangioproliferative Glomerulonephritis,
die Amyloidose (6),
die Poststreptokokken-Glomerulonephritis und
die Immunkomplexniere bei Lupus erythematodes (1).

Albumin (MG 68 000 Dalton) und Transferrin (MG 89 000 Dalton) charakterisieren die s e l e k t i v e Proteinurie. Es werden Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 100 000 Dalton ausgeschieden, die von der Basalmembran zwar filtriert, normalerweise jedoch von den Podozyten aufgenommen werden. Man vermutet deswegen eine Veränderung der epithelialen Podozyten und ihrer Haftstellen an der Membran (6).

Typisch ist die selektive Proteinurie für die Minimalchange-Nephropathie (Lipoidnephrose) bei Kindern. Eine Reduktion dieser Proteinurie kann mit einer Steroid-, Cyclophosphamid- oder Indomethazin-Therapie erreicht werden (6,22). Nach Vere und Walduck (41) ändert sich bei steroidinduzierter Remission nicht die Selektivität. Die "poröse Fläche" nimmt ab, nicht jedoch die Porengröße.

Vielfach unterscheidet man noch eine m ä ß i g - n i c h t - s e l e k t i v e Proteinurie mit Exkretion von Eiweißmolekülen in einer Größenordnung von 60 000 bis 150 000 Dalton. Diese Form der Proteinurie rechtfertigt ebenfalls einen Therapieversuch mit Steroiden (2, 24, 40).

b) Die tubuläre Proteinurie

Der komplexe Reabsorptionsschaden des proximalen Tubulus zeigt sich in einer Ausscheidung von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 10 000 und 70 000 Dalton. Dies charakterisiert

alle hereditären Tubulopathien,
die renale tubuläre Azidose,
die chronische Pyelonephritis,
Zystennieren,
das akute Nierenversagen,
die chronische Cadmiumvergiftung und
die erste postoperative Phase nach Nierentransplantationen (5, 34).

Eine Besserung des akuten Nierenversagens und ein gutes Funktionieren der transplantierten Niere zeigt sich zuerst in einem Verschwinden der kleinmolekularen Proteine. Es resultiert eine tubuläre Proteinurie mit Molekülen zwischen 40 000 und 70 000 Dalton. Diese Art der Proteinurie, die wohl mit einem partiellen Tubulusschaden korreliert, findet man auch bei der vaskulären und diabetischen Nephrosklerose.

Die Transplantatabstoßung wird mit dem Wiederauftauchen der niedermolekularen Proteine im Urin (10 000 bis 70 000 Dalton) signalisiert.

1.4. Die Proteinnachweismethoden im Urin

(11, 17, 23, 27, 28, 29, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 42)

1.4.1. Qualitativ lassen sich Proteine mit Sulfosalicylsäure nachweisen (17, 29, 40). Die Nachweisgrenze liegt bei 10 mg / 100 ml (35).

1.4.2. Eine semiquantitative Eiweißbestimmung gelingt mit Teststäbchen (Albustix, Fa. Miles/Ames). Ein Mindestgehalt von 20 mg / 100 ml Urin (35) ist erforderlich.

1.4.3. Zur quantitativen Proteinmessung im Urin eignen sich die Biuretmethode (33) mit einer Nachweisgrenze von 5 mg / 100 ml (27) und die Proteinbestimmung nach Lowry (26).

1.4.4. Eine Differenzierung von Proteinen ist möglich durch

a) Ultrazentrifugation (14),
b) Gelchromatographie (15, 19, 31, 41),
c) High Performance Liquid Chromatographie (36),
d) Immundiffusionsmethoden (24, 37),
e) Bestimmung des Selektivitätsindexes (11),
f) Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 22, 23, 25, 28, 30, 32, 34, 39, 42).

1.5. Die Problemstellung

Für die ambulante und stationäre Routinediagnostik von Proteinurien wurde in unserer Klinik bislang der Differentialprotein-Clearance nach Joachim et al. (24), in Kombination mit der Bestimmung des Selektivitätsindexes nach Cameron und Blandford (11), der Vorzug gegeben.

Dabei hat die Differentialprotein-Clearance nach Joachim et al. (24) für eine Routineuntersuchung folgende Nachteile:

1. Der Test dauert drei Tage.
2. Eine Differenzierung ist nur von wenigen, bestimmten Proteinen möglich.
3. Vom finanziellen Aspekt her ist diese Untersuchung relativ teuer.
4. Serum und Urin werden vom gleichen Tag benötigt.
5. Die visuelle Interpretation der Präzipitationsfront ist sehr subjektiv (1).
6. Für die Untersuchung in Serum und Urin finden Antikörper gegen Serumproteine Verwendung, nicht jedoch solche gegen Urinproteine (1).
7. Immunreaktive Bruchstücke und Aggregate können ebenso wie Kreuzantigenität zu falschen Ergebnissen führen (8, 37).
8. Der Test ist begrenzt auf glomeruläre Erkrankungen.
9. Eine Wiederholung des Testes ist immer dann erforderlich, wenn Antigenkonzentrationen im Urin den Meßbereich der Immundiffusionsplatten unter- oder überschreiten.
10. Die Selektivität korreliert nur gut mit den verschiedenen mikroskopischen Arten der Glomerulonephritis bei Patienten mit schwerer Proteinurie (2 g pro Tag oder mehr) (11).

Das Ziel dieser Untersuchung war es daher, einen möglichst einfachen und zuverlässigen Schnelltest zur Differenzierung von Proteinurien zu entwickeln. Gewählt wurde dafür die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn (42), modifiziert nach Cohen et al. (12) und Cohen (13).

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese soll die meiste Information über eine Proteinurie, im Einklang mit der Klinik geben (2). Durch ihre Empfindlichkeit eignet sie sich zur Frühdiagnose von Nierenkrankheiten und zur therapeutischen Verlaufskontrolle. Dadurch lassen sich den Patienten weitere Nierenbiopsien ersparen (1).

2. METHODIK

Es wurden Urine von 100 Patienten der nephrologischen Ambulanz der Universitätsklinik Würzburg untersucht. Die Proteinkonzentration der Urine lag durchwegs über 30 mg / dl.

2.1. Die Aufbereitung der Urine

Die Bestimmung der Urinproteinkonzentration erfolgte mittels Teststäbchen (Albustix, Firma Miles/Ames). Je nach Proteingehalt wurden die Urine vorbehandelt (siehe Tabelle 1), um eine Proteinmenge der Urinproben von 50 bis 100 µg pro Gel zu erhalten. Urinprobenvolumina zwischen 10 und 40 µl wurden in 50 µl Probenpuffer folgender Zusammensetzung gegeben:

1 % SDS,
0,01 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4,
10 % Glycerol,
0,002 % Bromphenolblau,
pH 7.2

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Urinproben drei Minuten bei 100 Grad Celsius erhitzt.

2.2. Die SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Urinproteine erfolgte nach Weber und Osborn (42), modifiziert nach Cohen (12, 13).

2.2.1. Die Herstellung der Stammlösungen

Für Lösung I wurden

22,2 g Acrylamid
0,6 g Methylenbisacrylamid (MBA)

in 100 ml aqua dest. gelöst.

Lösung II, 60 mg Ammoniumperoxysulfat
4 ml aqua dest.

mußte jedes Mal frisch angesetzt werden.

Lösung III enthielt 28,5 ml 1 M NaH_2PO_4,
145,0 ml 0,5 M Na_2HPO_4,
20,0 ml 10 % SDS
in 500 ml aqua dest.

Um für die Gele eine höhere Konzentration an SDS zu bekommen (0,18 % SDS nach Cohen statt 0,1 % SDS nach Weber und Osborn), pipettierte man zu 9,5 ml Lösung III noch 0,5 ml 10 % SDS (= Lösung IIIa).

Lösung IV bestand aus dem Katalysator
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED).

Für den Badepuffer wurde Lösung III vierfach mit aqua dest. verdünnt.

2.2.2. Das Gießen der Gele

Zu 4,0 ml Lösung I,
4,0 ml Lösung IIIa,
10,5 ml aqua dest.,
20 µl Lösung IV

wurden nach Entgasung
1,0 ml Ammoniumperoxysulfatlösung gegeben.

Mit dieser Lösungsmenge füllte man etwa zehn Gelröhrchen (innerer Durchmesser 0,5 cm, Länge 10 cm).

Man überschichtete die Gele mit 50 µl Wasser, die nach dem Erhärten wieder abgeschüttet wurden.

Die Röhrchen wurden in die Elektrophoresekammer (Abb. 1) eingebracht, maximal zwölf Stück.

Auf die Gele wurden vorsichtig die denaturierten Urinproteinproben aufgetragen und die Elektrophoresekammer mit Badepuffer aufgefüllt.

Pro Gel wendete man eine Stromstärke von 8 mA an (2103 Power Supply, LKB Biochrom). Die Anode wurde mit der unteren Kammer verbunden, die Kathode mit der oberen.

Nach dieser Methode dauerte die Elektrophorese etwa 100 Minuten. Sie war beendet, wenn die Bromphenolblaufront das Gel durchwandert hatte und sich etwa einen Zentimeter über dem unteren Rand befand.

2.2.3. Das Färben der Gele

Nach Markierung der Lösungsmittelfront mit Tusche wurden die Gele bei 80 Grad Celsius für zehn Minuten in einer Lösung folgender Zusammensetzung gefärbt:

450 ml Äthanol (96 %),
100 ml Eisessig,
5 g Coomassie-Brilliant-Blue (Fa. Serva)
aqua dest. ad 1000 ml.

2.2.4. Das Entfärben der Gele

In einer speziell angefertigten Elektrophoresekammer (Abb. 1) wurden die Gele entfärbt. Die Kammer füllten wir mit folgender Lösung:

75 ml Eisessig,
50 ml Äthanol (96 %),
aqua dest. ad 1000 ml.

Abbildung 1

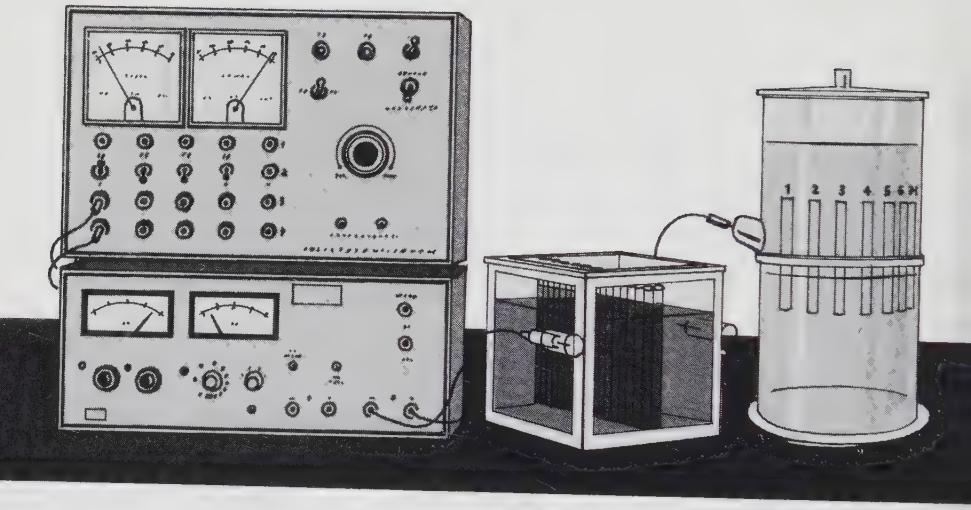


Abbildung 1 zeigt die Apparatur, die zum beschriebenen Proteindifferenzierungstest verwendet wurde. Rechts erkennt man die Elektrophoresekammer, in der maximal zwölf Gele gleichzeitig aufgetrennt werden können. In der Mitte befindet sich die Entfärbekammer, die für die Entfärbung von zwölf Gelen geeignet ist. Die Kammern besitzen Anschlüsse zu jeweils einem der beiden Netzgeräte (Fa. LKB), die links in der Abbildung stehen.

Acht bis zwölf Gele wurden bei einer Spannung von ca. 240 Volt innerhalb von dreißig Minuten entfärbt.

Eine andere Möglichkeit bestünde darin, die Gele bei 80 Grad Celcius unter mehrmaligem Wechseln der oben beschriebenen Entfärbelösung während zwei Stunden zu entfärben.

2.2.5. Die Auswertung der Gele

Die Auswertung der Gele erfolgte im Vergleich mit einem in gleicher Sitzung mitgelaufenen Standardgel, das vier Eichproteine auftrennte:

- Laktatdehydrogenase, MG 36 000 Dalton
  (Fa. Boehringer, Mannheim),
- Rinderserumalbumin, MG 68 000 Dalton
  (Fa. Serva),
- Phosphorylase, MG 100 000 Dalton
  (Fa. Boehringer, Mannheim),
- Immunglobulin G, MG 150 000 Dalton
  (Fa. Sigma).

Für die Dokumentation eignet sich die Fotographie der Gele mit einer Sofortbildkamera als schnellste objektive Methode.

Eine Befundung ist auch möglich durch zeichnerische Übertragung der angefärbten Proteinbanden auf den Vordruck eines Standardgels.

Eine zeitaufwendigere Methode ist die densitometrische Auswertung mit dem Beckman Spectrophotometer (Modell 25) bei einer Wellenlänge von 545 nm und einer Spaltgröße von zwei Millimetern.

2.3. Die Überprüfung der Ergebnisse

2.3.1. Die Immundiffusion

Unsere Ergebnisse bei der Differenzierung der Proteinurien wurden mit den Methoden von Joachim et al. (24) sowie von Cameron und Blandford (11) verglichen. Dazu verwendeten wir Immundiffusionsplatten und Proteinstandards der Firma Behring, Marburg.

Die Partigen-Immundiffusionsplatten enthalten das spezifische Antiserum gegen das jeweils angegebene Protein in einer Agargelschicht. Man gibt die vorgeschriebenen Probenvolumina in die vorgestanzten Auftragsstellen. Drei Stanzlöcher werden mit verschiedenen, genau bekannten Konzentrationen des jeweiligen Proteinstandards beschickt. Nach drei Tagen mißt man die Präzipitatdurchmesser aus. Die quadrierten Ringdurchmesser der Proteinstandardlösungen ergeben als Funktion der Konzentration eine Gerade (Abszisse: Antigen-Konzentration in mg / 100 ml, Ordinate: Quadrate der Ringdurchmesser in mm^2). Auf dieser Geraden wird die Proteinkonzentration der Untersuchungsproben abgelesen.

Mit dieser Methode bestimmten wir die Konzentrationen von Ig G und Transferrin im Serum und im 24-h-Urin des gleichen Tages.

Der Selektivitätsindex nach Cameron und Blandford (11) berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Selektivitätsindex} : \frac{\text{Ig G}_{\text{Urin}}}{\text{Ig G}_{\text{Serum}}} \times \frac{\text{Transferrin}_{\text{Serum}}}{\text{Transferrin}_{\text{Urin}}}$$

2.3.2. Die Biuret-Eiweißbestimmung

Um zu sichern, daß die Teststäbchen (Albustix, Fa. Miles/Ames) für die Proteinkonzentrationsbestimmung im Harn vor dessen elektrophoretischer Auftrennung ausreichen, bestimmten wir bei 20 Urinen die Proteinkonzentration nach der Biuretmethode (33, 40) und verglichen die Ergebnisse miteinander.

Vorgehen:

1 ml Urin wurde mit 1 ml Perchlorsäure (30 %) versetzt und kräftig geschüttelt. Nach fünfminütiger Wartezeit wurde fünf Minuten auf Höchststufe zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Niederschlag in 2.5 ml physiologischer Kochsalzlösung und 2.5 ml Biuretreagenz (Fa. Asid) gelöst und gemischt.

Ebenso verfuhren wir zur Kontrolle mit 0,1 ml Kontrollserum mit bekannter Proteinkonzentration (Fa. Asid).

Nach 30 Minuten wurde am Photometer bei der Wellenlänge 546 nm die Extinktion gegen einen Leerwert (2,5 ml physiologische NaCl-Lösung + 2.5 ml Biuretreagenz) gemessen. Mit Hilfe der Extinktion des Kontrollserums mit standardisierter Proteinkonzentration wurde die Urinproteinkonzentration berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die Proteinbestimmung im Urin

Die schnellste Methode, um Protein im Urin festzustellen, ist die Verwendung von Teststäbchen (Albustix, Fa. Miles, Ames). Auch Leskovar und Kratzer (25) empfehlen vor Konzentrierung des Harnes die Verwendung von Teststäbchen zur Messung der Existenz und des Grades einer Proteinurie. Falsch positive Befunde können auftreten bei alkalischem Urin (pH über 8) und bei Behandlung mit Polyvinylpyrrolidon, Chinin, Chinidin, Trimethoprim, Phenazopyridin und Chloroquin (40). Es empfiehlt sich daher bei alkalischem Urin und Verfärbung des Eiweißstäbchens bei ungesicherter Proteinurie, 1 ml Urin mit vier Tropfen fünfprozentiger Sulfosalicylsäure zu versetzen. Proteinurie verursacht Präzipitate (40).

Bei unseren Ambulanzpatienten war die Proteinurie durch vorhergehende Untersuchungen bereits bekannt gewesen.

Wir verglichen bei 20 Urinen die Ergebnisse der Albustix-Proteinkonzentrationsbestimmung mit denen der Biuret-Methode. Bei 16 Urinen lag die Proteinkonzentration, bestimmt mit Teststäbchen und nach der Biuret-Methode in der gleichen Größenordnung (durchschnittliche Differenz +/- 35 mg Protein pro 100 ml). Lediglich bei vier Urinen wäre der Unterschied so groß gewesen, daß sich eine Veränderung in der Verarbeitung ergeben hätte. Wir ignorierten den Biuret-Wert und hielten uns streng an unsere Vorschrift (Tab. 1) und erhielten damit diagnostisch gut verwertbare Ergebnisse hinsichtlich der Selektivität.

Die mit Teststäbchen gemessene Urinproteinkonzentration bestimmte also das weitere Vorgehen.

3.2. Die Vorbehandlung der Urine für die Elektrophorese

Tabelle 1 zeigt die Aufbereitung der Urinproben vor der Elektrophorese in Abhängigkeit der Proteinkonzentration.

Urinproteinkonzentrationen von 30 bis 100 mg / dl bedürfen vor der Elektrophorese folgender Behandlung:

Bei einer Proteinkonzentration von 30 mg / dl werden 5 ml Urin mit 5 ml 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Nach fünfminütiger Zentrifugation wird der Niederschlag in 0,2 ml 1 % SDS / 0.1 N NaOH aufgenommen. 10 µl dieser Lösung werden elektrophoretisch aufgetrennt.

Bei der Proteinkonzentration von 100 mg / dl versetzen wir 2 ml Urin mit 2 ml Trichloressigsäure (10 %). Nach Zentrifugation wird der Niederschlag ebenfalls in 0.2 ml 1 % SDS / 0.1 N NaOH aufgenommen. Wiederum werden 10 µl elektrophoretisch aufgetrennt.

Bei Proteinkonzentrationen zwischen 200 und 500 mg / dl ist eine Vorbehandlung der Urine vor der Elektrophorese nicht erforderlich.

Das Probenvolumen für die Elektrophorese beträgt bei einer Proteinkonzentration von 200 mg / dl, 40 µl, bei einer Konzentration von 300 mg / dl, 20 µl und bei einer Konzentration von 500 mg / dl, 10 µl.

Urine mit einer Proteinkonzentration über 1000 mg / dl müssen vor der Elektrophorese fünffach mit aqua dest. verdünnt werden. 20 µl werden auf das Gel pipettiert.

Tabelle 1

AUFBEREITUNG DER URINPROBEN IN ABHÄNGIGKEIT DER PROTEIN-KONZENTRATION

PROTEIN-KONZENTRATION mg/100 ml (Albustix)		PROBENVOLUMEN FÜR ELEKTRO-PHORESE µl
30	5 ml Urin + 5 ml 10 % TCA → Zentrifugation → Niederschlag in 0,2 ml 1 % SDS/ 0,1 N NaOH	10
100	2 ml Urin + 2 ml 10 % TCA → Zentrifugation → Niederschlag in 0,2 ml 1 % SDS/ 0,1 N NaOH	10
200	Urin unbehandelt	40
300	Urin unbehandelt	20
500	Urin unbehandelt	10
1000	Urin unbehandelt 1 : 5 verdünnt mit aqua dest.	20

3.3. Die Bedeutung des pH - Wertes der aufzutrennenden Proteinprobe bei der Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamid - Elektrophorese

Tabelle 2 begründet, warum Urine mit einem relativ niedrigen Proteingehalt wie in der vorausgegangenen Tabelle angegeben, vorbehandelt werden müssen. Anhand von zehn Urinen ist die Beziehung zwischen dem pH des Probenpuffers und der Urinprobe nach Säurefällung und Aufnahme in SDS / NaOH wiedergegeben. Bei einem Urin-pH zwischen 5 und 9 und einer Urinproteinkonzentration zwischen 30 und 100 mg / dl ergibt sich nach Trichloressigsäurefällung und Auflösung in SDS / NaOH durchwegs ein pH der Urinproteinproben zwischen 11 und 13. Lediglich der Zusatz von 10 µl dieser Urinproteinlösung gewährleistet eine relative pH-Stabilität des Probenpuffers. Diese pH-Stabilität mit Werten um 7 - 8 ist für eine scharfe elektrophoretische Auftrennung der Proteinbanden erforderlich. Nach Zusatz von 30 und 40 µl Urinproteinlösung zum Probenpuffer kommt es zu einem Abrutschen des pH-Wertes weit ins Alkalische (pH 9 - 10).

In Abbildung 2 sind zwei Urine zur Überprüfung der pH-Abhängigkeit des Probenpuffers, wie eben beschrieben, aufgetrennt. Man erkennt, daß es bei Vernachlässigung des pH-Wertes der aufzutrennenden Proteinprobe (rechtes Gel) zu einer mangelhaften elektrophoretischen Auftrennung kommt, einmal hinsichtlich der Wanderungsstrecke und zum anderen hinsichtlich der Dissoziierung in einzelne Proteinbanden. Links ist die gleiche Proteinprobe nach der in Tabelle 1 angegebenen Vorschrift aufgetrennt.

Tabelle 2

Beziehung zwischen pH des Probenpuffers und Urinprobe nach Säurefällung und Aufnahme in SDS/NaOH

Patientenname	W.K.♀	D.B.♂	M.U.♀	P.M.♀	N.J.♀	W.R.♀	S.A.♂	W.P.♂	B.P.♂	S.P.♀
Proteinkonzentration (Albustix) mg/100 ml	30	30	30	30	30	100	100	100	100	100
Urin pH	5	6	6/7	6	6	9	5/6	6	5/6	5/6
TCA-Fällung Auflösung in SDS/NaOH Urinprotein pH	10/11	12/13	12	12/13	12	12/13	11/12	12/13	12	12/13
10 µl Urinprotein + 50 µl Probenpuffer pH	7	8/9	8	8/9	8	8/9	7	8	8	8
20 µl Urinprotein + 50 µl Probenpuffer pH	8	9	8/9	9	8/9	9	8	8/9	8/9	8/9
30 µl Urinprotein + 50 µl Probenpuffer pH	8/9	9/10	9	9/10	9	9/10	8/9	9	9	9
40 µl Urinprotein + 50 µl Probenpuffer pH	9	10	9/10	10	9/10	10	9	9/10	9/10	9/10

Abbildung 2

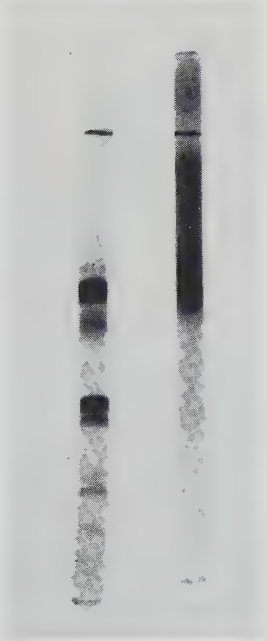


Abbildung 2 zeigt die elektrophoretische Auftrennung des Urins von einem Patienten mit nicht-selektiver Proteinurie.
Rechtes Gel: mangelhafte Auftrennung der Proteine bei Vernachlässigung des pH-Wertes des Probenpuffers.
Linkes Gel: Auftrennung nach der in Tabelle 1 angegebenen Vorschrift.

3.4. Typische Bandenmuster der verschiedenen Proteinurieformen

Sodiumdodecylsulfat reagiert mit Proteinen unter Bildung einer negativ geladenen Protein-SDS-Mizelle. Diese Mizellen wandern als Banden entsprechend ihrem Molekulargewicht im Gel von der Kathode zur Anode.

Abbildung 3 zeigt ein Standardgel mit vier Eichproteinen (linkes Gel). Man erkennt im Standardgel die Lactatdehydrogenase (LDH) mit dem Molekulargewicht ihrer Isomere von 36 000 Dalton, Albumin 68 000 Dalton, Phosphorylase 100 000 Dalton und Ig G mit 150 000 Dalton. Die niedermolekularen Marker LDH und Albumin wurden gewählt, um tubuläre Proteinurien im Vergleich mit dem Standardgel differenzieren zu können. Laut Boesken (5, 10) unterscheidet man zwei Formen von tubulärer Proteinurie: eine Exkretion von Eiweißen mit einem Molekulargewicht von 10 000 bis 70 000 Dalton und eine zwischen 40 000 und 70 000 Dalton.

Phosphorylase (MG 100 000) bildet definitionsgemäß den Grenzmarker zwischen selektiver und nicht-selektiver glomerulärer Proteinurie. Ig G (MG 150 000) trennt die mäßig-nicht-selektive Proteinurie von der nicht-selektiven.

In der Abbildung 3 sieht man neben dem Standardgel das Beispiel einer n i c h t - s e l e k t i v e n P r o t e i n u r i e (rechtes Gel). Bei dem hier dargestellten Patientenurin lassen sich eindeutig Proteinbanden über 150 000 Dalton nachweisen. Dieses Ergebnis spricht nach unserer Interpretation für eine nicht-selektive Proteinurie.

Die Abbildung 4 demonstriert ein Gel (rechts) nach elektrophoretischer Auftrennung des Urins eines Patienten mit m ä ß i g - n i c h t - s e l e k t i v e r P r o t e i n u r i e . Man erkennt Proteinbanden von über 100 000 Dalton, wobei jedoch Proteine über 150 000 Dalton nicht nachweisbar sind. Finden sich also Eiweiße zwischen 100 000 und 150 000 Dalton, so sprechen wir von einer mäßig-nicht-selektiven-Proteinurie.

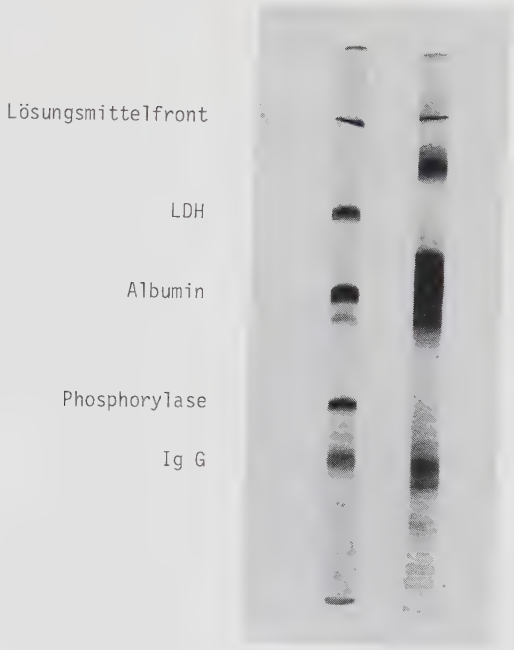
Die Abbildung 5 zeigt das Beispiel einer s e l e k t i v e n Proteinurie (linkes Gel). Es läßt sich lediglich eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von circa 60 000 Dalton nachweisen. Bei Proteinurien mit einem

Molekulargewicht kleiner als 100 000 Dalton sprechen wir von selektiver Proteinurie.

Auch die Abbildung 6 stellt die Wanderung der Urinproteine einer selektiven Eiweißausscheidung im elektrischen Feld dar. Diesmal erfolgte eine densitometrische Auswertung, die Peaks bei 68 000 und 74 000 Dalton aufwies.

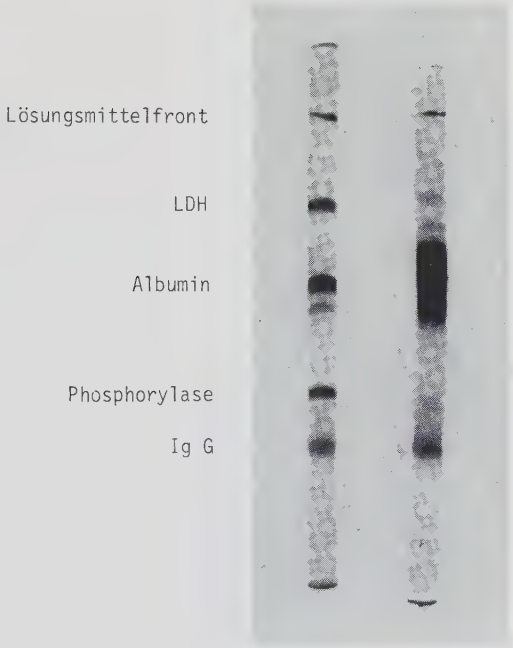
Das typische Bandenmuster einer t u b u l ä r e n Proteinurie erkennt man in Abbildung 7. Es handelt sich hier um den in der Einleitung beschriebenen partiellen Tubulusschaden mit einer Ausscheidung von 40 000 bis 70 000 Dalton großen Eiweißmolekülen. Wir fixierten das Ergebnis mit dem Beckman Densitometer.

Abbildung 3



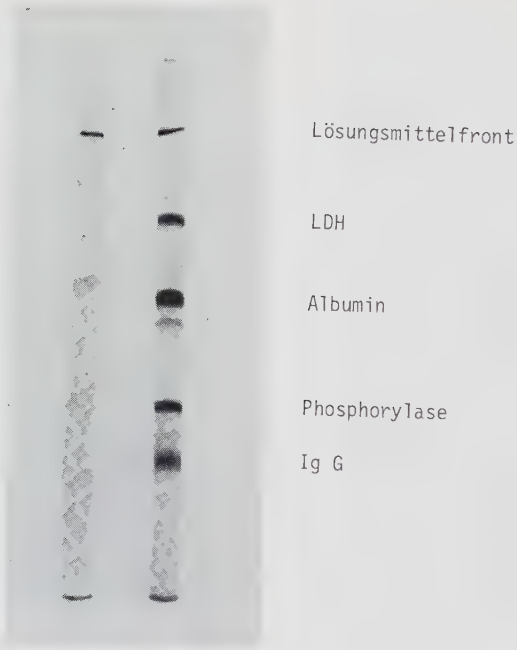
Elektrophoretische Auftrennung des Urins eines Patienten mit nicht-selektiver Proteinurie (rechtes Gel). Man erkennt eindeutig Proteinbanden über 150 000 Dalton.
Links ein Standardgel mit den Eichproteinbanden Ig G (150 000 Dalton), Phosphorylase (100 000 Dalton), Albumin (68 000 Dalton) und LDH (36 000 Dalton).

Abbildung 4



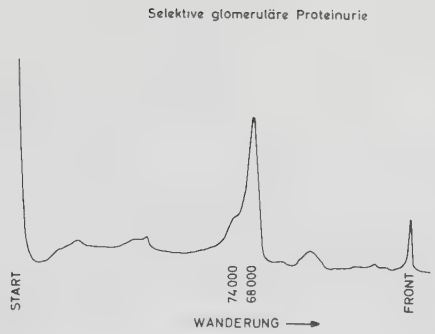
Beispiel einer mäßig-nicht-selektiven Proteinurie (rechtes Gel). Es finden sich keine Proteinbanden größer 150 000 Dalton.
Links ein Standardgel mit den Eichproteinbanden Ig G (150 000 Dalton), Phosphorylase (100 000 Dalton), Albumin (68 000 Dalton) und LDH (36 000 Dalton).

Abbildung 5



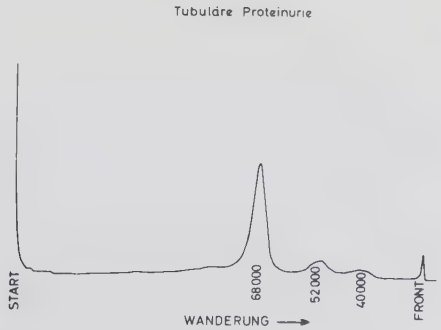
Beispiel einer selektiven Proteinurie (linkes Gel). Man erkennt eine Proteinbande in einer Größenordnung von 68 000 Dalton.
Rechts ein Standardgel mit den Eichproteinbanden Ig G (150 000 Dalton), Phosphorylase (100 000 Dalton), Albumin (68 000 Dalton) und LDH (36 000 Dalton).

Abbildung 6



Densitometrische Auswertung einer selektiven Proteinurie. Man erkennt Peaks bei 68 000 und 74 000 Dalton.

Abbildung 7



Typisches Bandenmuster einer tubulären Proteinurie im Molekulargewichtsbereich zwischen 40 000 und 70 000 Dalton.

4. DISKUSSION

4.1. Der Vergleich mit anderen Proteindifferenzierungsmethoden

Für die Differenzierung einer Proteinurie werden in der Literatur eine Vielzahl von Verfahren angeboten: Nach Bestimmung der Urinclearances von fünf bis sieben Plasmaproteinen unterschiedlichen Molekulargewichtes durch immunchemische Methoden (37) und Berechnung ihrer Verhältnisse in Prozent relativ zur Albumin- oder Transferrinclearance (24) ergibt der Anstieg der Regressionsgeraden (Abszisse: Molekulargewicht x 1/1000 Dalton,Ordinate: Prozent der Albumin- oder Transferrinclearance) auf logarithmischem Papier ein Maß für die Permeabilität der glomerulären Basalmembran (40).

Durch Messung der Urin-Clearance von Transferrin und Ig G mit Hilfe der Immundiffusion kann man einen Selektivitätsindex ermitteln (11), nämlich den Quotienten aus Transferrin- und Ig G - Clearance. Ein Selektivitätsindex kleiner als 0.1 spricht für eine selektive Proteinurie, ein Index über 0.2 für eine nicht-selektive Form. Mäßig-nicht-selektive Proteinurien haben Werte zwischen 0.1 und 0.2.

Weiterhin können Urinproteine mittels Ultrazentrifugation (14) differenziert werden. Aufgrund ihrer spezifischen Dichte sedimentieren Proteine unter dem Einfluß hoher Gravidationskräfte entsprechend ihrer Molekülgröße und Molekülform (23). Dieses Verfahren ist technisch wegen der Aufbringung der benötigten Gravidationskraft sehr aufwendig. Der Urin muß für die Untersuchungen konzentriert werden, Salze und Metaboliten müssen entfernt werden. Unter diesen Voraussetzungen ist die Ultrazentrifugation zwar eine sehr exakte Methode, für routinemäßige Untersuchungen jedoch nicht geeignet.

Bei der Gelchromatographie (15, 19, 41) werden Urinproteinlösungen in Chromatographiesäulen vorwiegend mit Sephadex G 100 molekulargewichtsbezogen aufgetrennt (23). Die Eiweißmoleküle passieren mit unterschied-

licher Flußrate die Säule, wobei die größermolekularen schneller eluiert werden. Da die Porengröße der Gele innerhalb einer Säule nicht variiert werden kann, muß unter Umständen mit zwei oder mehreren Säulen gearbeitet werden. Ein weiterer Nachteil besteht darin (41), daß die Proteine in Peaks mit beinahe Gaußscher Normalverteilung ausgewaschen werden. Aus der Überlappung der Randzonen resultieren Ungenauigkeiten in der Differenzierung. Für Routineuntersuchungen einer größeren Zahl von Urinproben täglich ist die Gelchromatographie zu langsam (20).

Eine Weiterentwicklung der Gelchromatographie ist in der High Performance Liquid Chromatographie, abgekürzt HPLC, gelungen (36). Sogar Peptide und Aminosäuren können innerhalb von vier Stunden exakt getrennt werden, wobei allerdings eine optimale Durchflußgeschwindigkeit des Elutionspuffers gewährleistet sein muß. Dies erfordert wiederum eine teure Apparatur.

Die am häufigsten in den letzten Jahren verwendete Methode zur Differenzierung einer Proteinurie ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2, 8, 25, 30, 39). Nach einer vergleichenden Untersuchung zwischen Zelluloseacetatelektrophorese, Immunelektrophorese und SDS-PAA-Gelelektrophorese kommen Balant et al. in ihrer 1974 publizierten Studie (2) zu der Überzeugung, daß die SDS-PAA-Gelelektrophorese die meiste Information in Übereinstimmung mit dem klinischen Bild der nephrologischen Erkrankung gibt. Auch Hardwicke (22) empfiehlt die SDS-PAA-Gelelektrophorese für die Routinediagnostik, da sie auch empfindlich für niedermolekulare Proteine ist.

Sodiumdodecylsulfat (SDS) macht Urineiweiße globulär und zwingt ihnen eine negative Überschußladung auf (23, 30, 42, 28). Nach Anlegen eines elektrischen Feldes trennen sich die anionischen Mizellen entsprechend ihrem Molekulargewicht auf. Das Molekulargewicht verhält sich umgekehrt proportional zur Wanderungsgeschwindigkeit, das heißt, niedermolekulare Proteine wandern schneller in Richtung Anode als hochmolekulare. Nach Weber und Osborn (42) ist damit eine streng molekulargewichtsbezogene Analyse der Proteine mit einer Genauigkeit von +/- 10 % möglich.

Anhand von 100 Patienten mit verschiedensten Formen von Proteinurie wurde eine Modifizierung der SDS-Gelelektrophoresemethoden erarbeitet, die durch Einfachheit und Schnelligkeit als Routinediagnostik vor allem für Ambulanzpatienten gedacht war. Ausgehend von der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach Weber und Osborn (42) wurde der Modifikation nach Cohen (12, 13) wegen der kurzen Laufdauer (ca. 100 min.) der Vorzug gegeben. Die Färbung der Gele bei 80 Grad Celsius (10 min.) und das anschließende elektrophoretische Entfärben (30 min. bzw. Entfärben bei 80 Grad Celsius) ermöglicht eine Auswertung der zu untersuchenden Urinprobe bereits nach ca. drei Stunden.

Um die Aufbereitung der jeweiligen Urinproben so schnell und so einfach wie möglich zu gestalten, erfolgte die Eiweißbestimmung mit der Teststreifenmethode. Auch unter Berücksichtigung falsch positiver Befunde bei alkalischem Urin sowie bei Behandlung mit verschiedenen Pharmaka und falsch negativen Resultaten bei stark saurem Urin ergibt ein Vorgehen wie in den Tabellen 1 und 2 beschrieben gut auswertbare und reproduzierbare Daten.

Tabelle 3 zeigt eine methodische Übersicht dieses Schnelltestes.

Das Resultat wird für das Krankenblatt durch das Fotographieren der Gele oder durch densitometrische Auswertung dokumentiert.

4.2 Die Nachteile des ß-Mercaptoäthanol

In Abwandlung der Methoden von Cohen (12, 13) und von Weber und Osborn (42) wird auf den Zusatz von ß-Mercaptoäthanol (1 %) zum Probenpuffer verzichtet. Ig G wird nach unseren Untersuchungen in Gegenwart von Mercaptoäthanol in zwei Proteinbanden zerlegt, die einem Molekulargewicht von 30 000 und 60 000 Dalton entsprechen (Abb. 8).

Die in Abb. 3 und 4 dargestellten Beispiele für eine nicht-selektive und eine mäßig-nicht-selektive Proteinurie erweisen sich bei Anwesenheit von Mercaptoäthanol als falsch selektiv (keine Proteinbande größer als 90 000 Dalton). Diese Befunde stehen in Einklang mit Hinweisen anderer Autoren (1, 30), daß Mercaptoäthanol zu einer Spaltung von Gamma-Globulinen führt.

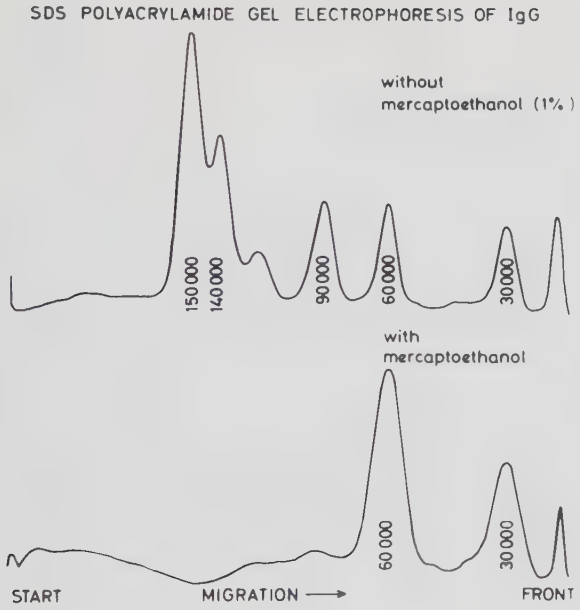
Allerdings neigt Albumin in Abwesenheit von Mercaptoäthanol nach unseren Daten zur Dimerisierung (Abb. 9). Inwieweit es sich bei dem von Boesken (9) angegebenen Urinprotein mit einem Molekulargewicht von 130 000 Dalton um einen diagnostisch verwertbaren Parameter oder um ein Albumin-Dimeres ohne Zugabe von Mercaptoäthanol handelt, kann gegenwärtig nicht entschieden werden.

Tabelle 3

METHODISCHE ÜBERSICHT DES SCHNELLTESTES ZUR DIFFERENZIERUNG VON PROTEINURIEN

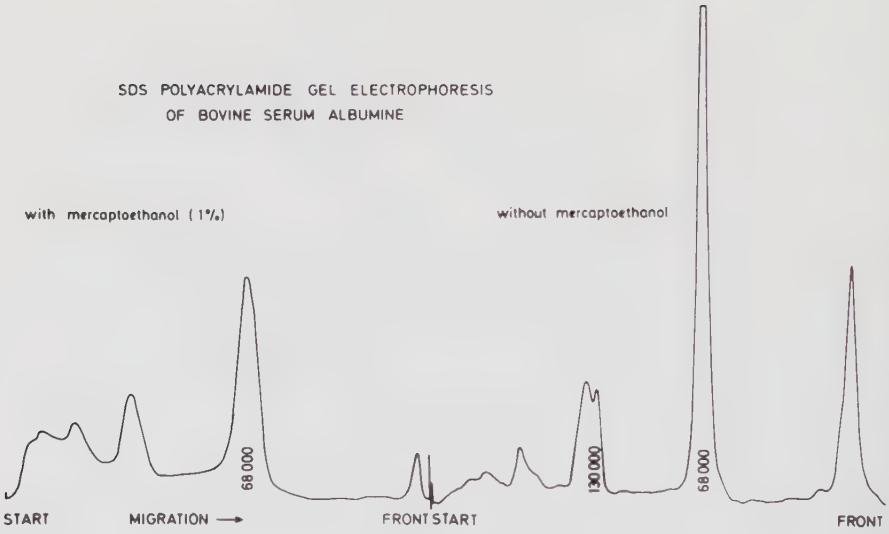
1. Aufbereitung der Urine	15 - 30 Min.
A. Messung der Proteinkonzentration mit Albustix	
B. Vorbereitung der Urinproben	
C. Dreiminütiges Erhitzen der Urinproben auf 100°C in Probenpuffer	
2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Cohen (1973)	
A. Herstellung der Gele (mit Entgasungs- und Erhärtungszeit)	30 - 40 Min.
B. Elektrophoresedauer	100 - 110 Min.
3. Färben der Gele bei 80°C in Coomassie-Blue	10 Min.
4. Elektrophoretische Entfärbung	30 Min.
	Ca. 3 1/2 h

Abbildung 8



20 µg Ig G (Fa. Sigma), gelöst in 20 µl destilliertem Wasser, wurde in Gegenwart von 1 %igem Mercaptoäthanol gelelektrophoretisch aufgetrennt (unten), bzw. ohne Zusatz von Mercaptoäthanol (oben).
Bei der densitometrischen Auswertung erkennt man den größten Peak des Immunglobulins bei einem Molekulargewicht von 150 000 Dalton. Die kleineren Peaks sind abgespaltene Ketten des Ig G. Unten erkennt man lediglich zwei Peaks des Ig G bei einem Molekulargewicht von 60 000 (heavy chain) und 30 000 Dalton (light chain).

Abbildung 9



10 µg Rinderserumalbumin (Fa. Serva), gelöst in 20 µl aqua dest., wurden mit und ohne Zusatz von 1 %igem Mercaptoäthanol aufgetrennt. Die densitometrische Analyse erfolgte für Albumin mit Mercaptoäthanol bei einer Papiergeschwindigkeit von 12.7 cm/min und bei einer Gelgeschwindigkeit von 5 cm/min. Die Auswertung für Albumin ohne Mercaptoäthanol wurde bei einer Papiergeschwindigkeit von 5 cm/min und einer Gelgeschwindigkeit von 2 cm/min ausgeführt. Die benutzte Wellenlänge betrug 546 nm. Man erkennt einen großen Peak bei einem Molekulargewicht von etwa 130 000 Dalton, wenn man auf die Zugabe verzichtet, was möglicherweise einem Albumin-Dimeren entspricht.

4.3. Die Lösung der Konzentrierungsprobleme

Manuel und Revillard (27) fordern für die Konzentrierung der Urine die Erfüllung dreier Bedingungen:

1. Leichte Durchführbarkeit
2. Schnelligkeit
3. Keine Denaturierung

Die Punkte 1 und 2 sind bei der Trichloressigsäurefällung und anschließender Auflösung des Niederschlages in SDS/NaOH erfüllt. Nach unserer Erfahrung verfälscht die Säuredenaturierung unser Ergebnis nicht und erzeugt auch keine zusätzlichen Artefakte, da die Urinproben im Probenpuffer vor der Elektrophorese, wie beschrieben, kurzzeitig erhitzt und damit sowieso denaturiert werden. Durch dieses Vorgehen entfällt ein zeitraubendes Ankonzentrieren von Urinproben mit niedriger Proteinkonzentration.

Chloressigsäuren produzieren in höheren Konzentrationen (ab 5 % Säurekonzentration) gute Fällungsergebnisse für jede Art von Protein. In niedrigeren Konzentrationen ist die Trübung abhängig vom isoelektrischen Punkt des jeweiligen Proteins, ähnlich der Sulfosalicylsäurefällung (17). Bei höheren Konzentrationen Trichloressigsäure vermutet man einen Dehydratationsmechanismus mit Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen nichtionisierter Chloressigsäure und Peptidgruppen (18), was für jedes Protein, unabhängig vom Molekulargewicht gute Fällungsergebnisse bringt. Besonders sensibel ist Trichloressigsäure, laut Ebina und Nagai (17) bei tubulärer Proteinurie.

Die Ultrafiltration (1, 2, 5, 8, 30, 34, 39) ist die schonendste Proteinanreicherung (25). Der pH-Wert und die Salzkonzentration werden gegenüber der Originalprobe nicht verändert. Für unsere Zwecke ist diese Methode, ebenso wie die Lyophilisierung, die Druck- und Absorptionsdialyse zu zeitaufwendig.

4.4. Die Ergebnisse dieser Methode im Gegensatz zu Differenzierungsschwierigkeiten mittels Immundiffusion und Selektivitätsindex

In den meisten der von uns geprüften Urinproben ergab sich eine enge Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den Methoden von Joachim et al. (24) sowie Cameron und Blandford (11).

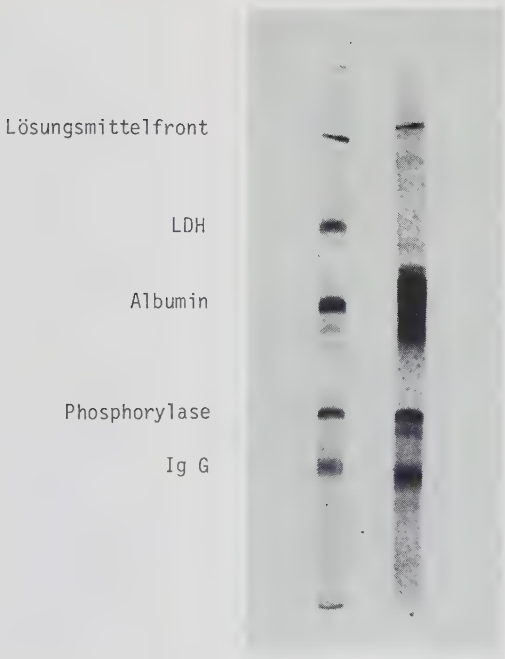
Zwei Ausnahmen mit Proteinurien von 3 g / 24 h sollen jedoch diskutiert werden, die unseres Erachtens nach Joachim et al. (24) sowie nach Cameron und Blandford (11) nicht sicher differenzierbar waren:

Ig G war im Urin des Patienten B.W.♂ mittels Immundiffusion unbestimmbar niedrig, so daß ein verwertbarer Selektivitätsindex nicht sicher zu errechnen war. Der Differentialprotein-Clearance entsprechend hätte es sich bei dem Patienten um eine selektive Proteinurie gehandelt. Die gelelektrophoretische Auftrennung, entsprechend oben ausgeführter Beschreibung, ergibt jedoch eindeutig Proteinbanden über 150 000 Dalton und damit eine nicht-selektive Proteinurie (Abb. 10).

Bei dem Patienten H.C.♂ ergab sich mittels Differentialprotein-Clearance eine mäßig-nicht-selektive Proteinurie mit einem Index von 0.14. Dabei war jedoch die Ig G-Konzentration im Serum außergewöhnlich hoch. Unserer Differenzierung zufolge handelte es sich bei dem Patienten wiederum eindeutig um eine nicht-selektive Proteinurie (Abb. 11). Extremwerte von Transferrin oder Ig G im Serum verfälschen offensichtlich bei manchen Patienten das Differenzierungsergebnis.

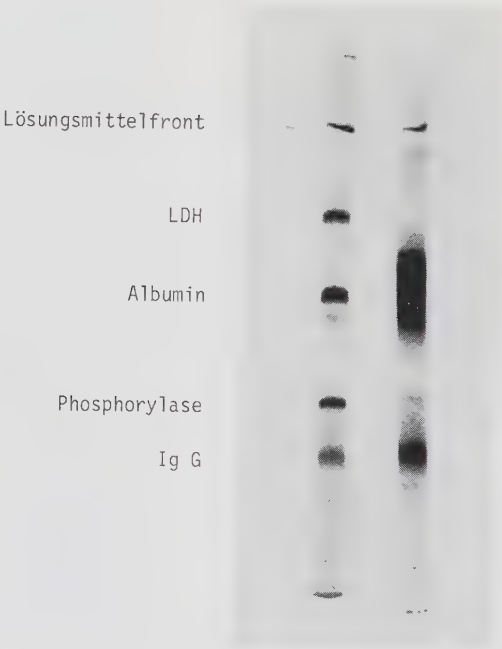
Abweichungen in der Beurteilung der Selektivität einer Proteinurie von den Ergebnissen, ermittelt nach Cameron und Blandford (11) sind auch von White et al. (43) unter Verwendung der Sephadex-Säulen-Chromatographie mitgeteilt.

Abbildung 10



Gelelektrophoretische Auftrennung eines Urins mit einem Proteingehalt von 300 mg / dl. Mittels Immundiffusion war Ig G im Urin unbestimmbar niedrig, so daß der Selektivitätsindex nach Cameron und Blandford eine selektive Proteinurie ergeben hatte. Man erkennt eindeutig Banden über 150 000 Dalton, was eine nicht-selektive Proteinurie beweist.
Links ein Standardgel mit den Eichproteinbanden Ig G (150 000 Dalton), Phosphorylase (100 000 Dalton), Albumin (68 000 Dalton) und LDH (36 000 Dalton).

Abbildung 11



Das rechte Gel zeigt eine nach unseren Differenzierungsmethoden nicht-selektive Proteinurie. Ig G war bei diesem Patienten im Serum außergewöhnlich hoch, so daß der Selektivitätsindex von Cameron und Blandford verfälscht wurde und eine mäßig-nicht-selektive Proteinurie ergab. Links ein Standardgel mit den Eichproteinbanden Ig G (150 000 Dalton), Phosphorylase (100 000 Dalton), Albumin (68 000 Dalton) und LDH (36 000 Dalton).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Untersuchung war dahingehend ausgerichtet, für die Routinediagnostik einer Proteinurie einen einfachen und zuverlässigen Schnelltest anzugeben, der vor allem für Ambulanzpatienten Diagnostik und Therapie beschleunigt und vereinfacht.

Danach erfolgt die Differenzierung mit Hilfe der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn (42), modifiziert nach Cohen (12,13), in Abwesenheit von ß-Mercaptoäthanol im Probenpuffer.

Die Standardisierung der Proteinurie wird durch vier Eichproteine erreicht, die auf einem "Standardgel" gleichzeitig elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Das elektrophoretische Entfärben beschleunigt den früher langwierigeren Entfärbevorgang.

Auf diese Weise gelingt die schnelle Identifizierung einer selektiven, nichtselektiven, mäßig-nicht-selektiven und tubulären Proteinurie. Das Resultat wird durch das Fotographieren der Gele für das Krankenblatt dokumentiert.

Herrn Professor Dr. med. August Heidland danke ich sehr für die Überlassung des Themas.

Herrn Professor Dr. med. Kurt Kochsiek danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Hörl bedanke ich mich besonders herzlich, der mir durch seine jederzeit gewährten Ratschläge und durch seine Erfahrung beim Durchführen dieser Arbeit geholfen hat.

Mein Dank gilt auch den Technischen Assistentinnen der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, Traudel Stöcker, Margarete Röder und Ingrid Henneberger, die mir durch praktische Hilfe den Einstieg in die Laborarbeit erleichterten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Balant, L., Fabre, J.:
Clinical relevance of different electrophoretic methods for the analysis of urinary proteins.
In: Dubach, U.C., Schmid, U., (eds):
Diagnostic significance of enzymes and proteins in urine.
Huber, Bern/Stuttgart/Vienna 216, 1978

2. Balant, L., Mulli, J.C., Fabre, J.:
Urinary protein analysis with sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis - a comparison with other analytical techniques.
Clin. Chim. Acta 54, 27, 1974

3. Berggard, I.:
Proteins in normal human urine
In: Manuel, Y., Revillard, J.P., Betuel, H., (eds):
Plasma proteins in normal and pathological urine.
S.Karger Basel, 7, 1970

4. Boesken, W.H.:
Discelectrophoretic molecular weight analysis of urinary proteins.
Contr. Nephrol. 1, 143, 1975

5. Boesken, W.H.:
Die tubuläre Proteinurie
Klin. Wschr. 53, 473, 1975

6. Boesken, W.H.:
Molekulargewichtsbezogene Analyse der Proteinurie als Beitrag zur Diagnose renaler Erkrankungen.
Med. Klin. 71, 441, 1976

7. Boesken, W.H.:
Diagnostic significance of SDS-PAA- electrophoresis of urinary proteins: different forms of proteinuria and their correlation to renal diseases.
In: Dubach, U.C., Schmidt, U., (eds):
Diagnostic significance of enzymes and proteins in urine.
Huber, Bern/Stuttgart/Vienna 235, 1978

8. Boesken, W.H., Kopf, K., Schollmeyer, P.:
Differentiation of proteinuric diseases by disc-elektrophoretic molecular weight analysis of urinary proteins.
Clin. Nephrol. 1, 311, 1973

9. Boesken, W.H., Schindera, F., Billingham, M., Hardwicke, J., White, R.H., Williams, A.:
Polymeric albumin in the urine of patients with nephrotic syndrome.
Clin. Nephrol. 8, 395, 1977

10. Boesken, W.H., Schmidt, M., Jontofsohn, R., Heinze, V.:
Proteinuria as diagnostic marker after human kidney transplantation.
Proc. E.D.T.A. 1, 333, 1974

11. Cameron, J.S., Blandford, G.:
The simple assessment of selectivity in heavy proteinuria.
Lancet 2, 242, 1966

12. Cohen, P.:
The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase and the molecular basis of its activation reactions.
Eur. J. Biochem. 34, 1, 1973

13. Cohen, P., Duewer, T., Fischer, E.:
Phosphorylase from dogfish skeletal muscle. Purification and a comparison of its physical properties to those of rabbit muscle phosphorylase.
Biochemistry 10, 2683, 1971

14. Creeth, J.M., Kekwick, R.A., Flynn, F.V., Harris, H., Robson, E.B.:
An ultracentrfuge study of urine proteins with particular reference to the proteinuria of renal tubular disorders.
Clin. Chim. Acta 8, 406, 1963

15. Davis, J.S., Flynn, F.V., Platt, H.S.:
The characterisation of urine protein by gel filtration.
Clin. Chim. Acta 21, 357, 1968

16. Deetjen, P.:
Physiologische Grundlagen der Niere und der ableitenden Harnwege.
In: Siegenthaler, W.:
Klinische Pathophysiologie. Thieme Verlag 1976

17. Ebina, S., Nagai, Y.:
Reevaluation of turbidimetry of proteins by use of aromatic sulfonic acids and chloroacetic acids.
Clin. Chem. 25/2, 247, 1979

18. Grimbleby, F.H., Ntailianas, H.A.:
Binding of trichloroacetic acid by proteins.
Nature 189, 835, 1961

19. Hardwicke, J.:
Estimation of renal permeability to protein on Sephadex G 200.
Clin.Chim.Acta 12, 89, 1965

20. Hardwicke, J., Cameron, J.S., Harrison, J.F., Hulme, B., Soothill, J.F.:
Proteinuria studied by clearances of individual macromolecules.
In: Manuel, Y., Revillard, J.P., Betuel, H.:
Proteins in normal and pathological urine.
S. Karger Basel 111, 1970

21. Hardwicke, J.:
Physiological basis of proteinuria.
In: Peeters (Ed.):
Protides of the biological fluids.
Pergamon Press 341, 1973

22. Hardwicke, J.:
Laboratory aspects of proteinuria in human disease.
Clin. Nephrol. 3, 37, 1975

23. Hörl, W.H.:
Proteinurie - Moderne Nachweismethoden.
5. Nephrologisches Seminar, Heidelberg, 29.-31.01.1981.

24. Joachim, G.R., Cameron, J.S., Schwartz, M., Becker, E.L.:
Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome.
J. Clin. Invest. 43, 2332, 1964

25. Leskovar, P., Kratzer, M.:
Elektrophoretische Erfassung der einzelnen Harnproteinfraktionen.
Med. Welt 30/47, 1777, 1979

26. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, C.A., Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265, 1951

27. Manuel, Y., Revillard, J.P.:
Study of urinara proteins by zone electrophoresis methods and principles of interpretion.
In: Manuel, Y., Revillard, J.P., Betuel, H.:
Proteins in normal and pathological urine.
S. Karger Basel 153, 1970

28. Maurer, H.R.:
Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.
Walter de Gruyter Verlag Berlin 1971

29. Meulemans O.:
Determination of total protein in spinal fluid with sulfosalicylic acid and trichloroacetic acid.
Clin. Chim. Acta 5, 757, 1960

30. Pesce, A.J., Boreisha, I., Pollak, V.E.:
Rapid differentiation of glomerular and tubular proteinuria by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 40, 27, 1972

31. Peterson, A., Evrin, P.E., Berggard I.:
Differentiation of glomerular, tubular and normal proteinuria. Determination of urinary excretion of beta-2-microglobulin, albumin and total protein.
J. Clin. Invest. 48, 1189, 1969

32. Porzio, M.A., Pearson, A.M.:
Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 490, 27, 1977

33. Rieder, H.P.:
Determination of total protein.
In: Curtius, Roth (eds):
Clinical Biochemistry. Principles and methods.
Walter de Gruyter Verlag Berlin 1468, 1974

34. Sethi, K., First, M.R., Pesce, A.J., Fidler, J.P., Pollak, V.E.:
Proteinuria following renal transplantation.
Nephron 18, 49, 1977

35. Sieberth, H.G.:
Erkrankungen der Niere.
In: Gross, R., Schölmerich, P.:
Lehrbuch der Inneren Medizin.
Schattauer Verlag 1977

36. Sjödahl, J.:
High resolution liquid chromatography of proteins.
Science tools 27, 4, 1980

37. Soothill, J.F.:
Estimation of eight serum proteins by a gel diffusion precipitin technique.
J. Lab. Clin. Med. 59, 859, 1962

38. Stolte, H., Alt, J., Schurek, H.J.:
Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Differentialdiagnostik der Proteinurie.
Klin. Wochenschr. 19, 1069, 1979

39. Thanner, F., Wartha, R., Gekle, D.:
Molekulargewichtsbezogene Analyse der physiologischen Proteinurie Neugeborener.
Klin. Wochenschr. 57, 285, 1979

40. Thomas, L.:
Urin-Eiweißausscheidung
In: Thomas, L.:
Labor und Diagnose
Med. Verlagsgesellschaft Marburg 355, 1978

41. Vere, D.W., Walduck, A.W.:
The chemical estimation of renal selective permeability to proteins during steroid induced remission of the nephrotic syndrome.
Clin. Sci. 30, 315, 1966

42. Weber, K., Osborn, M.:
The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406, 1969

43. White, R.H., Mills, R.J., Beetham, R., Raine, D.N.:
The significance of variation in the selectivity of proteinuria.
Clin. Nephrol. 3, 42, 1975

L E B E N S L A U F

Name:	Ulrike Ursula Otremba
geboren am:	15.07.1956 in Würzburg
Vater:	Heinz Otremba, Geschäftsführer
Mutter:	Hanna-Lisa Otremba, geb. Wurzel, Hausfrau
Familienstand:	ledig
Bildungsweg:	
1962 - 1966	Volksschule in Würzburg
1966 - 1975	Neusprachliches Gymnasium der St.Ursula-Schule Würzburg
1975	Abitur
1975 - 1982	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vom 13.04.1981 bis 14.03.1982	Praktisches Jahr an der Universitäts-Kinderklinik, der Chirurgischen Universitätsklinik und der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
06./22.04.1982	Dritter Teil des medizinischen Staatsexamens
26.04.1982	Approbation

Ulrike Otremba